第 37 卷第 2 期
2017 年 1 月
生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA
Vol.37,No.2
Jan.,2017

DOI: 10.5846/stxb201508041642
王长庭,王根绪,李香真,王永,字洪标,阿的鲁骥.氮肥添加对高寒藏嵩草(*Kobresia tibetica*)沼泽化草甸和土壤微生物群落的影响.生态学报,2017,37(2):405-415.
Wang C T, Wang G X, Li X Z, Wang Y, Zi H B, A De Luji.Effects of N addition on the plant and soil microbial community in alpine *Kobresia tibetica* meadow of Qinghai-Tibet Plateau.Acta Ecologica Sinica,2017,37(2):405-415.

氮肥添加对高寒藏嵩草(*Kobresia tibetica*)沼泽化草甸和土壤微生物群落的影响

王长庭[1,*],王根绪[2],李香真[3],王 永[1],字洪标[1],阿的鲁骥[1]
1 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041
2 中国科学院水利部成都山地灾害与环境研究所, 成都 610041
3 中国科学院成都生物所, 成都 610041

摘要:以藏嵩草沼泽化草甸为研究对象,利用磷脂脂肪酸(PLFA)技术,研究连续 6 年 N 素添加对地上植被群落数量特征、土壤微生物群落结构的影响。结果表明:① 藏嵩草沼泽化草甸群落生物量、枯枝落叶对施肥处理无明显响应,且莎草科植物对土壤氮素的吸收和利用率较低。② 施肥增加了 0—10 cm 土壤微生物类群 PLFAs 丰富度,尤其细菌和革兰氏阳性菌 PLFAs,降低了 10—20 cm PLFAs 丰富度;③ 磷脂脂肪酸饱和脂肪酸/单烯不饱和脂肪酸、细菌 PLFAs/真菌 PLFAs 的比值随土壤层次增加而增加;④ 0—10 cm 土层,革兰氏阳性菌、真菌 PLFAs 含量与 pH、土壤速效磷、速效氮、土壤有机质显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$);10—20 cm 土层,细菌、革兰氏阳性菌、真菌和总 PLFAs 含量与土壤有机质含量显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。表明藏嵩草沼泽化草甸微生物 PLFAs 含量和丰富度对施肥的响应存在明显的土层梯度效应,土壤微生物 PLFAs 含量和丰富度主要受表层土壤初始养分含量的影响。
关键词:藏嵩草草甸;磷脂脂肪酸(PLFA);微生物群落;氮添加

Effects of N addition on the plant and soil microbial community in alpine *Kobresia tibetica* meadow of Qinghai-Tibet Plateau

WANG Changting[1,*], WANG Genxu[2], LI Xiangzhen[3], WANG Yong[1], ZI Hongbiao[1], A De Luji[1]
1 *College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu* 610041, *China*
2 *Institute of Hazards and Environment, Chinese Academic of Sciences, Chengdu* 610041, *China*
3 *Chengdu Institute of Biology, Chinese Academic of Sciences, Chengdu* 610041, *China*

Abstract: Effects of continuous six-year N addition on the quantitative properties of plant and soil microbial communities in alpine *Kobresia tibetica* meadows were investigated experimentally by using field surveys and phospholipid fatty acid (PLFA) analyses. The experiment included four manipulative treatments involving both N and litter: added N (+N) with the litter removed (LR), +N with the litter left intact (LI), LI without N addition (−N), and LR with −N. Soil samples were collected at the depths of 0—10 and 10—20 cm. Aboveground biomass (AGB), litter biomass, microbial community composition, and nutrient content were measured. The results showed that (1) fertilization did not have significant effects on AGB and litter biomass. (2) N addition significantly increased the abundance of the microbial group PLFAs at the soil depth of 0—10 cm, particularly the abundance of the bacterial PLFAs (B PLFAs) and gram-positive bacterial PLFAs (G^+

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2013CBA01807);国家自然科学基金项目(31370542);中央高校基本科研业务费优秀科研团队及重大孵化项目(2014NZYTDO1)

收稿日期:2015-08-04; **网络出版日期:**2016-06-13

*通讯作者 Corresponding author.E-mail: wangct@swun.edu.cn

PLFAs), but decreased microbial abundances at the soil depth of 10—20 cm. (3) The ratio of the normal saturated fatty acids/monounsaturated fatty acids and B PLFAs/fungal PLFAs (F PLFAs) increased with the increase in the soil depth. (4) G^+ PLFA and F PLFA contents were significantly and positively correlated to pH, available phosphorus, available nitrogen, and soil organic matter contents at 0—10 cm soil depth. The contents and abundance of fatty acids were mainly regulated and affected by initial nutrient level in the topsoil after short-term N addition. These results indicate that microbial communities in this alpine tundra are sensitive to both litter and N inputs, and that the vertical structures of these communities are particularly vulnerable.

Key Words: *Kobresia tibetica* meadow; phospholipid fatty acid (PLFA); microbial community; n addition

草地施肥是一种维持草地生态系统养分平衡的重要管理措施。一方面,草地施肥能够补充土壤营养物质,提高植物群落初级生产力,降低物种丰富度和群落多样性[1-6]。另一方面,由于微生物参与凋落物分解、硝化与反硝化作用等地下生态过程,同时其数量、活性和群落结构受到氮输入剧增的影响[7],但施 N 对草地土壤微生物特性的影响效应仍存在很大的不确定性[8],如施 N 降低了土壤微生物量[9-10];施 N 增加了放线菌的磷脂脂肪酸(PLFA),但真菌的 PLFA 不受施 N 影响[11]。因此,外源性 N 的输入不仅影响草地群落初级生产力、草地生态系统土壤可利用 N 素的状况,更重要的是影响土壤微生物组成和多样性及其与植物之间的关系。

有关植物吸收土壤有机 N 的研究,人们从土壤有机 N 的可利用性、植物吸收有机 N 能力以及根系对有机 N 吸收的机理等进行了探讨和总结[12-15]。研究发现:在高寒草甸、极地苔原,土壤有机 N 的矿化速率低,可利用无机 N 的供应不足,而土壤中却富含大量的自由态氨基酸[16-18],且植物每年摄取的 N 量远高于土壤 N 净矿化量[19-21]。特别是高寒沼泽湿地生态系统中,不同植物种对土壤 N 素的吸收存在差异和多元化的特点[22]。因此,植物在获取 N 素营养中的多元化是对目前陆地 N 循环理解的一种挑战[23-24]。

N 输入对土壤微生物的影响更多地反映在微生物群落的结构和功能上,而土壤微生物量、微生物活动和群落结构的变化又会通过改变凋落物分解、养分利用和 C、N 循环等重要的土壤生态系统功能和过程做出响应[25]。近年来,基于生物化学(phospholipid fatty acid PLFA)、生理学(Biolog)和分子生物学(PCR-RFLP、T-RFLP、RISA 等)方法的发展,弥补了传统培养方法的不足,可以比较全面了解在各种条件下微生物群落结构变化情况[26-30]。磷脂脂肪酸(PLFA)法是一种快速、可靠并可重现的分析土壤微生物群落结构的方法,可用于表征在数量上占优势的土壤微生物群落[31]。因此,本论文以高寒藏嵩草草甸为研究对象,利用 PLFA 技术通过分析土壤 PLFA 含量及其组成,试图了解外源性 N 素添加对地上植被、土壤微生物的影响,植物与土壤微生物之间对氮素养分存在竞争关系?土壤微生物群落空间分布格局?探索植物群落生物量、凋落物、微生物群落结构与土壤养分之间的关系,为明确高寒草地生态系统 N 吸收、利用提供理论依据。

1 研究地区概况

本研究于 2005—2010 年 8 月在中国科学院海北高寒草甸生态系统开放实验站乱海子进行。37°37′ N,101°18′ E,平均海拔为 3 200 m,年平均气温-1.7℃,最高气温为 23.7 ℃,最低气温为-37.1 ℃;年平均降雨量为 560 mm,主要降水量集中在 5—9 月份,约占年降水量的 85%[32]。

藏嵩草沼泽化草甸(*Kobresia tibetica* of swamp meadow),群落结构简单,仅有草本一层,群落平均高度 10—25 cm,群落总覆盖度 80%—95%,优势种主要是藏嵩草(*Kobresia tibetica*)、帕米尔苔草(*Carex pamirensis*),次优势种和伴生种有华扁穗草(*Blysmus sinocompressus*)、黑褐苔草(*Carex atrofusca*)、早熟禾(*Poa* spp.)、溚草(*Koeleria cristata*)等,伴生种有小金莲花(*Trollius pumilus*)、甘青报春(*Primula tangutica*)、星状风毛菊(*Saussurea stella*)等,土壤类型为有机寒冻潜育土[22-33]。藏嵩草草甸土壤中总 N 浓度为 14.45 g/kg,铵态 N 浓度为 31—39 mg/kg,硝态 N 浓度为 69—114 mg/kg,土壤无机 N 占总 N 的 0.7%—1.1%[22]。

2　材料与方法

2.1　试验设计及样品采集

选择 2—3 hm^2植被生长均匀、未退化的藏嵩草草甸(冬春草场)用围栏保护。2005 年 4 月中旬在围栏内选择面积为 50 m × 50 m 的地势平坦样区,分成 2 个平行试验样区,试验样区间距为 2 m;每个样区 6 个面积为 4 m × 3 m 的小样区,小样区间距为 2 m,各个小样区四角用木桩标记。每个小样区设置 4 个 1 m × 1 m 测定样方,样方间间距 0.5 m,以双因素随机区组实验设计在每个样方中进行施肥处理(0 g/m^2、20 尿素(46.65% N) g/m^2) 和凋落物处理 (凋落物剔除、凋落物不剔除),共 24 个施肥、24 个凋落物处理样方。2005—2010 年,每年 5 月下旬施肥(尿素 46.65% N)1 次。

2005—2010 年,每年的 11 月从凋落物剔除样方中人工剔除枯枝落叶(现存量);凋落物不剔除样方中 2005—2010 年枯枝落叶现存量的累计数量表示其总量。

试验处理包括 N 添加 (+N)+ 枯枝落叶剔除(litter removed (LR)): +N+LR;N 添加(+N)+枯枝落叶不剔除(litter left intact (LI)): +N+LI;N 不添加(-N)+枯枝落叶剔除(litter removed (LR)): LR+(-N);N 不添加(-N)+枯枝落叶不剔除(litter left intact (LI)): LI+(-N)[3]。

2.2　群落调查与样品采集

2.2.1　群落调查、生物量

6 个 1 m × 1 m 样方进行植物群落特征(所有植物种的分盖度、高度和频度,以及植物群落的总盖度)调查,然后齐地面分种剪草(收获法),剪去植物地上部分后在 1 m × 1 m 样方的中心区域划出 50 cm ×50 cm 样方,用手收取枯枝落叶,所有植物样品在 65°C 烘箱 48 小时烘干至恒重,称取生物量(包括枯枝落叶)。

2.2.2　土壤样品

2008—2010 年,在测定过地上生物量的样方中,采用 25 cm ×25 cm 样方采集植物地下根系 (0—10 cm、10—20 cm) 的同时,沿土壤剖面分层采集 0—10 cm、10—20 cm 土层土壤样品,过 2 mm 筛,四分法选取 3 个 500g 土样分成两份,一份冷藏带回实验室保存于-70 ℃ 超低温冰箱,用于测定土壤微生物 PLFA 分析;一份带回实验室风干,用于测定土壤有机质,总 N、总磷、速效 N 和速效磷,土壤 pH 用 pHS-3 酸度计测定(1:2.5 土水比)[34]。

2.2.3　土壤 PLFA 测定

取相当于 6.0 g 冷冻干燥的土壤样品,采用改进的 Bligh-Dyer 方法[35]通过氯仿-甲醇-柠檬酸缓冲液振荡提取总脂,经硅胶柱层析分离得到磷脂脂肪酸,将得到的磷脂脂肪酸甲脂化,然后采用 HP7890-HP5975 型气相色谱质谱联用仪(GC-MS)分析磷脂脂肪酸的组成[36]。检测中升温程序如下:进样后在 50 ℃保持 1 min,之后以 12 ℃/min 的速率升到 180 ℃,保持 2 min 后以 6 ℃/min 的速率升到 220 ℃,停留 2 min 后以 15 ℃/min 的速率升到 240 ℃,保持 1 min 后以 15 ℃/min 的速率达到最终温度 260 ℃,并保持 15 min。

气相色谱与质谱之间的连接温度为 280 ℃,用高纯氦气(1 mL/min)作载气。质谱仪采用电子电离(EI)方式,电子能量为 70 eV。PLFA 的定性根据质谱标准图谱和已有的相关报道[37],以正十九烷脂肪酸甲酯内标物进行定量计算。

脂肪酸含量的计算公式如下:

$$\mathrm{PLFA(nmol/g)} = 1000\times(\mathrm{PPLFA}\times S\times V)/(\mathrm{POSTD}\times M\times W)$$

式中,PPLFA 和 POSTD 分别为样品和标准物质的峰面积,S 为标准物质的浓度(μg/mL),V 为样品的测定体积(mL),M 为相应磷脂脂肪酸的摩尔质量(g/mol),W 为干土的质量(g)。PLFA 采用脂肪酸的常用命名方法[26]。PLFA 可以作为微生物生物量和群落结构变化的生物标记分子。根据已有的研究结果,指示特定微生物的 PLFA 生物标记物如下表(表 1)。

表 1　藏嵩草草甸土壤 PLFA 生物标记物

Table 1　PLFA biomarkers for indicating the type of microbes in *Kobresia tibetica* meadow

微生物类型 Microbial group	磷脂脂肪酸标记 Phospholipids fatty acids signatures	参考文献 References
一般性细菌 General Bacteria (B PLFAs)	11:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 19:0	[26, 38]
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria (G^+PLFAs)	i14:0, i16:0, i17:0, i18:0, a13: 0, a15:0, a17:0, a18:0, br15:0, br16:0, br17:0, br18:0, br19:0	[39-40]
革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria (G PLFAs)	16:1ω7t, 18:1ω4, 18:1ω7, 18:1ω11, 18:1ω12	[26,39-42]
真菌 Fungi (F PLFAs)	18:1ω9, 18:1ω9t, 16:1ω11, 18:1ω6t	[43-44]
单烯不饱和脂肪酸 Monounsaturated fatty acids (MONO)	(18:1ω9, 18:1ω9t, 16:1ω11, 18:1ω6t) + (16:1ω7t, 18:1ω4, 18:1ω7, 18:1ω11, 18:1ω12)	[37, 45]
一般饱和脂肪酸 Normal saturated fatty acids (SAT)	(11:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 19:0) + (i14:0, i16:0, i17:0, i18:0, a13: 0, a15:0, a17:0, a18:0, br15:0, br16:0, br17:0, br18:0, br19:0)	[39, 46]

2.3　数据分析

磷脂脂肪酸定量测定用峰面积和内标曲线法。PLFA 含量用 nmol/g 表示。本文数据运用 Microsoft Excel 2010 处理数据,SPSS 19.0 用于土壤微生物 PLFAs 含量方差分析(ANOVA)Duncan($P=0.05$)、相关性分析(Correlation analysis)Pearson ($P=0.05$), Canoco for Windows(4.5)用于土壤微生物 PLFA 含量的主成分分析(Principal components analysis, PCA)。

3　结果与分析

3.1　地上生物量和枯枝落叶

连续 6 年施肥、枯枝落叶处理对高寒藏嵩草草甸群落地上生物量、枯枝落叶量的影响如图 1 和表 2。群落地上生物量在+N+LR、+N+LI、LR+(-N)、LI+(-N)处理,不同年份及其交互作用下有微弱变化($0.05<P<0.10$)。枯枝落叶仅在年份有微弱变化($0.05<P<0.10$),而在各处理间和交互作用的差异不显著(附表、图)。

3.2　土壤微生物类群的变化

不同处理条件下高寒藏嵩草草甸各类群微生物 PLFAs 含量和 PLFAs 总量差异明显。在+N+LI、LR+(-N)处理中,0—10 cm 土层微生物各类群 PLFAs 含量明显高于 10—20 cm 土层,LI+(-N)处理中除 G^+ PLFAs 外,其他菌群 0—10 cm 土层 PLFAs 含量均高于 10—20 cm 土层;但在+N+LR 中,0—10 cm 土层总 PLFAs、B PLFAs 含量低于 10—20 cm 土层(图 1)。

不同处理中,一般饱和脂肪酸 /单烯不饱和脂肪酸(SAT/MONO)、F PLFAs 与 B PLFAs(F PLFAs/B PLFAs)的比值均随土层增加而增加;施肥和枯枝落叶的积累提高了 10—20 cm 土层 G^+ PLFAs/G^- PLFAs 的比值(图 1)。高寒藏嵩草草甸土壤各类群 PLFAs 含量随土壤层次增加而增加,特别是 B PLFAs,说明不同处理条件下不同土层微生物组成比例发生明显变化。

3.3　PLFAs 主成分分析(PCA)

为进一步分析不同处理土壤微生物群落结构差异,对不同处理、不同土层高寒藏嵩草草甸土壤微生物磷脂脂肪酸结构(PLFA)进行主成分分析(图 2)。结果发现:不同的处理条件下在 PC 轴上的分布存在明显差异。在 0—10 cm 土层中,第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)的贡献率分别为 53%和 29.5%,累计贡献率为 82.5(图 2a)。在 10—20 cm 土层中,第一主成分(PC1)的贡献率为 54.9%,第二主成分(PC2)的贡献率为 24.0%,累计贡献率为 78.9%。

在 0—10 cm 土层,LI 和 LR 处理下,+N+LR 和+N+LI 分别位于 LR+(-N)和 LI+(-N)右侧,+N 增加了 C14:0、C19:0、a15:0、C11:0、a18:0、C17:0、i18:0、16:1ω7t 和 C15:0,因此+N 能够增加土壤微生物丰富度,尤其是增加 B PLFAs 和 G^+ PLFAs 含量。由于+N+LR 与 LR+(-N)在 PC1 轴上的水平距离显著小于+N+LI 与

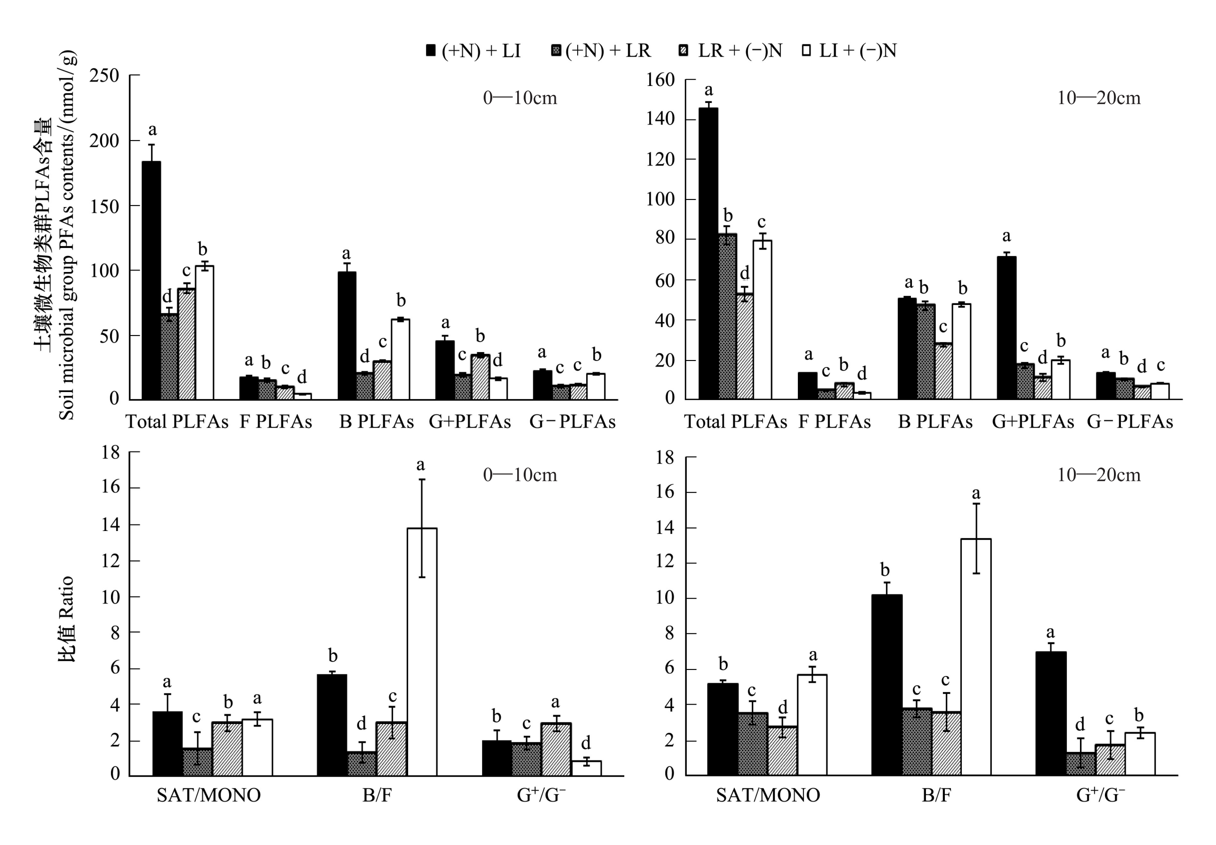


图 1　高寒藏嵩草草甸不同土层微生物类群 PLFAs 含量的变化

Fig.1　Changes of microbial group PLFAs contents at the 0—10 cm, 10—20 cm soil depth in the *Kobresia tibetica* meadow

B PLFAs:细菌 bacterial PLFAs;F PLFAs:真菌 fungal PLFAs;G^+ PLFAs:革兰氏阳性菌 Gram-positive bacterial PLFAs;G^- PLFAs:革兰氏阳性菌 Gram-negative bacterial PLFAs;SAT:一般饱和脂肪酸 normal saturated fatty acid;MONO:单烯不饱和脂肪酸 monounsaturated fatty acid

LI+(-N),因此,LR 在+N 处理下,增加 B PLFAs 和 G^+ PLFAs 的效应显著低于 LI。在-N 处理下,LI 位于 LR 左侧;在+N 处理下,LI 位于 LR 右侧,可见+N 处理对土壤微生物群落结构的影响大于 LR 的影响。

在 10—20 cm 土层,+N 和-N 处理下,LI 均位于 LR 右侧,说明凋落物的移除效应大于 N 肥效应对土壤微生物群落结构的影响,尤其是 F PLFAs(18:1ω9t)的多样性。

3.4　土壤理化性质

由表 2 可知,除土壤全磷外,不同处理、土层作用对 pH、全 N、速效 N、速效磷和土壤有机质含量有极显著影响(P<0.001),处理和土层交互作用极显著影响 pH 和土壤有机质(P<0.01),但对土壤全 N、全磷、速效 N 和速效磷的交互作用不明显(P > 0.05)。

表 2　不同处理条件下高寒藏嵩草草甸土壤理化性质(0—10 cm, 10—20 cm)方差分析

Table 2　ANOVA for Soil physical-chemical properties in the 0—10 and 10—20 cm soil layers under varying urea N addition and litter manipulations in a *Kobresia tibetica* meadow (Data present mean±SE, n=3)

项目 Items	pH			土壤全 N TN/ (g/kg)			土壤全磷 TP/ (g/kg)		
	df	*F*	*P*	*df*	*F*	*P*	*df*	*F*	*P*
处理 Treatment	3, 24	15.354	< 0.001	3, 24	33.139	< 0.001	3, 24	0.187	0.904
土层 Depth	1, 24	4.139	0.059	1, 24	65.131	< 0.001	1, 24	46.996	< 0.001
处理 × 土层 Treatment × Depth	3, 24	4.992	< 0.013	3, 24	0.740	0.544	3, 24	0.311	0.817

项目 Items	土壤速效 N AN/ (mg/kg)			土壤速效磷 AP/ (mg/kg)			土壤有机质 SOM/ (g/kg)		
	df	*F*	*P*	*df*	*F*	*P*	*df*	*F*	*P*
处理 Treatment	3, 24	5.633	0.008	3, 24	6.353	0.005	3, 24	10.861	< 0.001
土层 Depth	1, 24	38.577	< 0.001	1, 24	59.036	< 0.001	1, 24	127.538	< 0.001
处理 × 土层 Treatment × Depth	3, 24	0.974	0.429	3, 24	2.052	0.147	3, 24	4.383	0.020

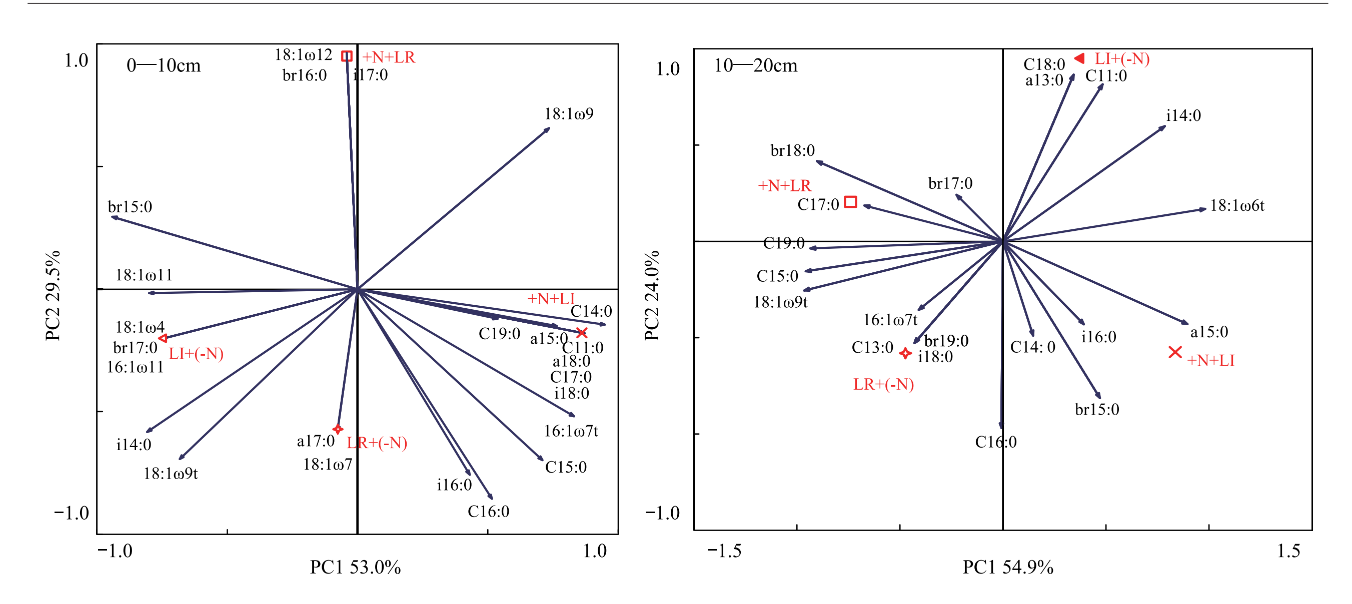


图 2 不同处理条件下高寒藏嵩草草甸土壤微生物(0—10 cm, 10—20 cm)PLFA 主成分分析

Fig.2 Principal component analysis (PCA) of soil microbial phospholipid fatty acid (PLFA) signatures detected in the 0—10 cm top and 10—20 cm soil layers in treatment plots with urea N addition and litter manipulations

3.5 群落生物量与各类群 PLFA 相关性分析

通过对各菌群 PLFAs 与土壤养分进行相关性分析(表 3)。结果表明:0—10 cm 土层,G^+ PLFAs 含量与 pH ($P=0.028$)、AP ($P=0.011$)、SOM ($P=0.008$) 显著或极显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$);G^- PLFAs 含量与 TN ($P=0.011$) 显著负相关;F PLFAs 含量与 TN($P=0.012$)、AN ($P=0.002$)、AP ($P=0.004$)、SOM ($P=0.011$)显著或极显著正相关 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

10—20 cm 土层,F PLFAs 含量与 AP($P=0.045$)显著正相关;除 G^- PLFAs ($P=0.333$)外,B PLFAs ($P=0.015$)、G^+ PLFAs ($P=0.000$)、F PLFAs ($P=0.033$)和总 PLFAs 含量($P=0.000$)与 SOM 含量显著或极显著正相关 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 3 不同处理条件下高寒藏嵩草草甸土壤养分与 PLFAs 含量的相关性分析

Table 3 Correlation between soil nutrients and microbial PLFAs contents in the 0—10 and 10—20 cm soil layers with urea N addition and litter manipulations from 2008—2010

项目 Items	土壤深度 Soil depth/cm		pH	土壤全 N TN	土壤全磷 TP	土壤速效 N AN	土壤速效磷 AP	土壤有机质 SOM
细菌 B PLFAs	0—10	Pearson correlation	0.026	−0.369	0.090	−0.014	0.373	0.279
		Sig.	0.936	0.237	0.780	0.965	0.233	0.381
		N	12	12	12	12	12	12
革兰氏阳性菌		Pearson correlation	0.630 *	0.414	−0.163	0.181	0.699 *	0.723 **
G^+ PLFAs		Sig.	0.028	0.180	0.613	0.574	0.011	0.008
		N	12	12	12	12	12	12
革兰氏阴性菌		Pearson correlation	−0.143	−0.582 *	0.147	−0.157	0.173	0.069
G^- PLFAs		Sig.	0.658	0.047	0.649	0.625	0.592	0.832
		N	12	12	12	12	12	12
真菌 F PLFAs		Pearson correlation	0.334	0.695 *	0.001	0.785 **	0.755 **	0.704 *
		Sig.	0.288	0.012	0.998	0.002	0.004	0.011
		N	12	12	12	12	12	12
总量 Total PLFAs		Pearson correlation	0.204	−0.133	0.036	0.107	0.542	0.467
		Sig.	0.525	0.681	0.912	0.740	0.069	0.126
		N	12	12	12	12	12	12

续表

项目 Items	土壤深度 Soil depth/cm		pH	土壤全 N TN	土壤全磷 TP	土壤速效 N AN	土壤速效磷 AP	土壤有机质 SOM
细菌 B PLFAs	10—20	Pearson correlation	-0.183	-0.303	-0.084	-0.139	0.043	0.678 *
		Sig.	0.569	0.338	0.796	0.666	0.894	0.015
		N	12	12	12	12	12	12
革兰氏阳性菌		Pearson correlation	0.175	0.209	-0.110	-0.074	0.503	0.866 **
G^+ PLFAs		Sig.	0.587	0.515	0.734	0.819	0.096	0.000
		N	12	12	12	12	12	12
革兰氏阴性菌		Pearson correlation	0.422	0.239	0.170	0.319	0.013	0.306
G^- PLFAs		Sig.	0.172	0.455	0.596	0.313	0.969	0.333
		N	12	12	12	12	12	12
真菌 F PLFAs		Pearson correlation	0.439	0.517	-0.077	0.071	0.586 *	0.616 *
		Sig.	0.153	0.085	0.812	0.826	0.045	0.033
		N	12	12	12	12	12	12
总量 Total PLFAs		Pearson correlation	0.157	0.143	-0.096	-0.057	0.436	0.890 **
		Sig.	0.627	0.657	0.767	0.859	0.157	0.000
		N	12	12	12	12	12	12

** 相关性在 0.01 水平上显著; * 相关性在 0.05 水平上显著

4　讨论与结论

为维持草地生态系统养分平衡、促进退化草地的恢复,施肥在国外一些畜牧业发达的国家已经是一项常规的草地管理措施[47]。因此,外源 N 的输入将可能在很大程度上改变草地生态系统可利用 N 素的状况,从而对草地生态系统初级生产力、土壤碳库产生重要影响。例如:N 肥添加能够增加土壤中有效 N 含量,尤其是被植物能够利用的速效 N 含量,刺激植物的生长,增加植物-土壤中有机碳的积累。短期的 N 肥添加可以提高群落生产力,而过度施加 N 肥则会使土壤–植被中营养元素失衡,造成土壤酸化,对植被生产力的恢复和提高产生不利影响[3, 48-49],过量追加 N 肥不利于高寒草甸群落植被结构的改善和群落生产力的提高[50-51]。N 添加对高寒草甸地下生物量、植物总生物量无显著影响[5]。这些相互矛盾的结果可能与高寒草甸群落物种组成、初始微生物类群、土壤 pH、有机质以及土壤养分含量的不同有关。研究发现,藏嵩草草甸以多年生莎草科植物为优势种,建群种为藏嵩草,且连续 6a 施肥对高寒藏嵩草草甸群落地上生物量、枯枝落叶的影响不明显。王文颖等[22]藏嵩草草甸 7 种植物对 N 的吸收的研究发现,莎草科植物如:藏嵩草、华扁穗草和黑褐苔草对 3 种 N 形态的吸收值均很低,且对不同形态 N 素的吸收差异不显著。植物群落组成、物种本身特征和外部环境资源对高寒草甸物种多样性和生产力有着重要的影响[33]。不同植物种由于其生长型、生长发育时期[52]以及 N 源的可利用性不同[53],植物对土壤 N 素的吸收和利用上可能存在差异。高寒草甸植物的生长很有可能受土壤中起始有机质、可利用 N 含量的限制。因此,高寒草甸植物群落地上生物量、枯枝落叶对外源性 N 添加的响应也不尽一致。

草地土壤微生物量对施 N 的响应,由于不同的施肥量、不同的肥料类型、施肥时间长短、草地初始 N 水平都会对土壤微生物量产生影响[8]。本研究显示:施肥与否,0—10 cm 土层微生物各类群 PLFAs 含量明显高于 10—20 cm 土层。施肥能增加 0—10 cm 土壤微生物 PLFAs 的丰富度,尤其 B PLFAs 和 G^+ PLFAs 的丰富度,但降低了 10—20 cm 土壤微生物群落 PLFAs 丰富度。说明藏嵩草沼泽化草甸微生物 PLFAs 含量和丰富度对施肥的响应仅体现在不同土层梯度上。河岸地带等湿地莎草科物种分布广泛、群落结构单一且生产力水平高[54],其地下生物量影响地下生物地球化学过程、湿地土壤的发展[55]。在高寒草甸特别是藏嵩草沼泽化草甸群落,其地下根系大部分集中在 0—10 cm 土层,土壤养分同样也分布在 0—10 cm[56, 33]。施肥可能刺激了植物根系的生长以及根系分泌物输出,为土壤输入大量新鲜碳源,有利于土壤微生物生长。而且植被根系扰

动能显著改善深层土壤结构,降低土壤致密性,进而提高微生物数量[57]。藏嵩草沼泽草甸由于土壤水分含量高,土壤 pH 偏碱性,使土壤表层的好气和兼性厌气性细菌和放线菌大量繁殖,形成表层微生物生物量高,深层生物量相对低的格局[58]。

土壤磷脂脂肪酸 SAT/MONO、B PLFAs/F PLFAs 的比值往往与微生物群落所受到的养分胁迫及化学或物理干扰有关[59];微生物 PLFA 含量和类型的多样性作为监测土壤环境的指标,能及时有效地判别土壤养分的变化情况[60]。研究表明,藏嵩草沼泽化草甸 SAT/MONO、B PLFAs/F PLFAs 的比值随土壤层次增加而增加,特别是 B PLFAs,说明施肥可以缓解 0—10 cm 土壤微生物群落的养分胁迫,而且 0—10 cm 土层初始养分含量、根系生物量高,有利于对环境变化抗性较好,类群较稳定的 G^+ PLFAs 含量的提高[61],表层土壤系统可能越趋于稳定。另外,藏嵩草沼泽化草甸土壤全量和速效养分含量均高于矮嵩草草甸、小嵩草草甸等[34],对大多数的微生物种类都具有良好的刺激作用,有利于提高微生物量、稳定藏嵩草草甸群落地上生物量,从而维持土壤不同土层的生态功能,尤其是表层。

土壤表层,大部分增加的 N 被矿化了,N 素可能影响了碳含量的改变[62];Hagedorn 等[63]认为是 N 输入通过降低土壤中腐殖质的分解速度来增加土壤碳储量。土壤总 PLFAs、F PLFAs、B PLFAs、G^+ PLFAs、G^- PLFAs 的含量以及土壤全量养分、速效养分含量随土层深度的增加呈降低趋势。本研究中,与土壤养分的相关分析表明:0—10 cm 土层,G^+ PLFAs 含量与 pH、AP、SOM 显著正相关;F PLFAs 含量与 TN、AN、AP、SOM 显著正相关。10—20 cm 土层,B PLFAs、G^+ PLFAs、F PLFAs 和总 PLFAs 含量与 SOM 含量显著正相关。说明随土层加深土壤微生物代谢活动很可能受到更强的限制,而表层土壤适宜的水热条件、充足的 N 源以及良好的通气状况更能满足微生物代谢与繁殖的需要,是促进土壤微生物累积的有利条件。

因此,对于藏嵩草沼泽化草甸,添加 N 素之所以具有高的土壤养分(如:0—10 cm),但群落生产力变化不明显,可能是基于以下几个方面的原因:1)适度施肥对有机质向土壤输入的促进作用比对有机质分解的促进作用大,有利于表层土壤养分吸存[64];2)短期施肥内,土壤微生物 PLFAs 含量和丰富度由表层土壤初始养分调控的程度大于施 N 的直接调控作用;3)高寒沼泽湿地生态系统中,莎草科植物对土壤 N 的利用较低[22],最终减少对群落地上生物量的影响;4)pH 增大使微生物群落的胁迫压力有所缓解,提高了土壤系统的稳定性,为微生物量的形成提供了比较稳定的环境,从而增加了土壤微生物量[65]。此外,土壤微生物本身对时空格局变化的响应可能存在较大差异,短期的施肥实验也可能掩盖生态系统对实验处理的敏感性和滞后效应。因此,开展长期性的野外定位实验、多因子综合控制实验将有助于全面理解高寒草甸生态系统地上、地下部分的互作机制。

参考文献(References):

[1] Hillebrand H, Gruner D S, Borer E T, Bracken M E S, Cleland E E, Elser J J, Harpole W S, Ngai J T, Seabloom E W, Shurin J B, Smith J E. Consumer versus resource control of producer diversity depends on ecosystem type and producer community structure. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(26): 10904-10909.

[2] 李禄军, 曾德慧, 于占源, 艾桂艳, 杨丹, 毛琮. 氮素添加对科尔沁沙质草地物种多样性和生产力的影响. 应用生态学报, 2009, 20(8): 1838-1844.

[3] Wang C T, Long R J, Wang Q L, Liu W, Jing Z C, Zhang L. Fertilization and litter effects on the functional group biomass, species diversity of plants, microbial biomass, and enzyme activity of two alpine meadow communities. Plant and Soil, 2010, 331(1/2): 377-389.

[4] 杨中领. 青藏高原东部高寒草甸群落结构和功能对施肥和放牧的响应[D]. 兰州: 兰州大学, 2011.

[5] 杨晓霞, 任飞, 周华坤, 贺金生. 青藏高原高寒草甸植物群落生物量对氮、磷添加的响应. 植物生态学报, 2014, 38(2): 159-166.

[6] Printice I C, Farquhar G, Fasham M J R, Goulden M L, Heimann M, Jaramillo V J, Kheshgi H S, Le Quéré C, Scholes R J, Wallace D W R. The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide // Houghton J, ed. IPCC Third Assessment Report. Cambridge: Cambridge University Press, 2001: 184-237.

[7] 沈菊培, 贺纪正. 微生物介导的碳氮循环过程对全球气候变化的响应. 生态学报, 2011, 31(11): 2957-2967.

[8] 何亚婷, 董云社, 齐玉春, 肖胜生, 刘欣超. 草地生态系统土壤微生物量及其影响因子研究进展. 地理科学进展, 2010, 29(11): 1350-1359.

[9] Compton J E, Watrud L S, Porteous L A, Degrood S. Response of soil microbial biomass and community composition to chronic nitrogen additions

at Harvard forest. Forest Ecology and Management, 2004, 196(1): 143-158.

[10] Wallenstein M D, McNulty S, Fernandez I J, Boggs J, Schlesinger W H. Nitrogen fertilization decreases forest soil fungal and bacterial biomass in three long-term experiments. Forest Ecology and Management, 2006, 222(1/3): 459-468.

[11] Clegg C D, Lovell R D L, Hobbs P J. The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(2): 263-270.

[12] 莫良玉, 吴良欢, 陶勤南. 高等植物对有机氮吸收与利用研究进展. 生态学报, 2002, 22(1): 118-124.

[13] Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U. Uptake of organic nitrogen by plants. New Phytologist, 2009, 182(1): 31-48.

[14] 王文颖, 刘俊英. 植物吸收利用有机氮营养研究进展. 应用生态学报, 2009, 20(5): 1223-1228.

[15] 徐兴良, 白洁冰, 欧阳华. 植物吸收土壤有机氮的研究进展. 自然资源学报, 2011, 26(4): 715-724.

[16] Xu X L, Ouyang H, Cao G M, Pei Z Y, Zhou C P. Uptake of organic nitrogen by eight dominant plant species in *Kobresia meadows*. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2004, 69(1): 5-10.

[17] Nordin A, Schmidt I K, Shaver G R. Nitrogen uptake by arctic soil microbes and plants in relation to soil nitrogen supply. Ecology, 2004, 85(4): 955-962.

[18] Miller A E, Bowman W D, Suding K N. Plant uptake of inorganic and organic nitrogen: Neighbor identity matters. Ecology, 2007, 88(7): 1832-1840.

[19] Henry H A L, Jefferies R L. Plant aminoacid, soluble N turnover and microbial N capture in soils of a grazed Arctic saltmarsh. Journal of Ecology, 2003, 91(4): 627-636.

[20] 曹广民, 吴琴, 李东, 胡启武, 李月梅, 王溪. 土壤-牧草氮素供需状况变化对高寒草甸植被演替与草地退化的影响. 生态学杂志, 2004, 23(6): 25-28.

[21] Miller A E, Bowman W D. Alpine plants show species-level differences in the uptake of organic and inorganic nitrogen. Plant and Soil, 2003, 250(2): 283-292.

[22] 王文颖, 周华坤, 杨莉, 李锦萍, 汪新川. 高寒藏嵩草(*Kobresia tibetica*)草甸植物对土壤氮素利用的多元化特征. 自然资源学报, 2014, 29(2): 249-255.

[23] Lipson D, Näsholm T. The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. Oecologia, 2001, 128(3): 305-316.

[24] Jones D L, Healey J R, Willett V B, Farrarb J F, Hodge A. Dissolved organic nitrogen uptake by plants—An important N uptake pathway? Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(3): 413-423.

[25] 张乃莉, 郭继勋, 王晓宇, 马克平. 土壤微生物对气候变暖和大气 N 沉降的响应. 植物生态学报, 2007, 31(2): 252-261.

[26] Frostegård A, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. Biology and Fertility of Soils, 1996, 22(1/2): 59-65.

[27] 张秋芳, 刘波, 林营志, 史怀, 杨述省, 周先治. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸 PLFA 生物标记多样性. 生态学报, 2009, 29(8): 4127-4137.

[28] Feng X J, Simpson M J. Temperature and substrate controls on microbial phospholipid fatty acid composition during incubation of grassland soils contrasting in organic matter quality. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(4): 804-812.

[29] Castro H F, Classen A T, Austin E E, Norby R J, Schadt C W. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(4): 999-1007.

[30] Hollister E B, Schadt C W, Palumbo A V, Ansley R J, Boutton T W. Structural and functional diversity of soil bacterial and fungal communities following woody plant encroachment in the southern Great Plains. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(10): 1816-1824.

[31] 颜慧, 蔡祖聪, 钟文辉. 磷脂脂肪酸分析方法及其在土壤微生物多样性研究中的应用. 土壤学报, 2006, 43(5): 851-859.

[32] Wang W Y, Ma Y G, Xu J, Wang H C, Zhu J F, Zhou H K. The uptake diversity of soil nitrogen nutrients by main plant species in *Kobresia humilis* alpine meadow on the Qinghai-Tibet Plateau. Science China Earth Sciences, 2012, 55(10): 1688-1695.

[33] Wang C T, Cao G M, Wang Q L, Jing Z C, Ding L M, Long R J. Changes in plant biomass and species composition of alpine *Kobresia* meadows along altitudinal gradient on the Qinghai-Tibetan Plateau. Science in China Series C: Life Sciences, 2008, 51(1): 86-94.

[34] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 13-169.

[35] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911-917.

[36] White D C, Flemming C A, Leung K T, MacNaughton S J. In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. Journal of Microbiological Methods, 1998, 32(2): 93-105.

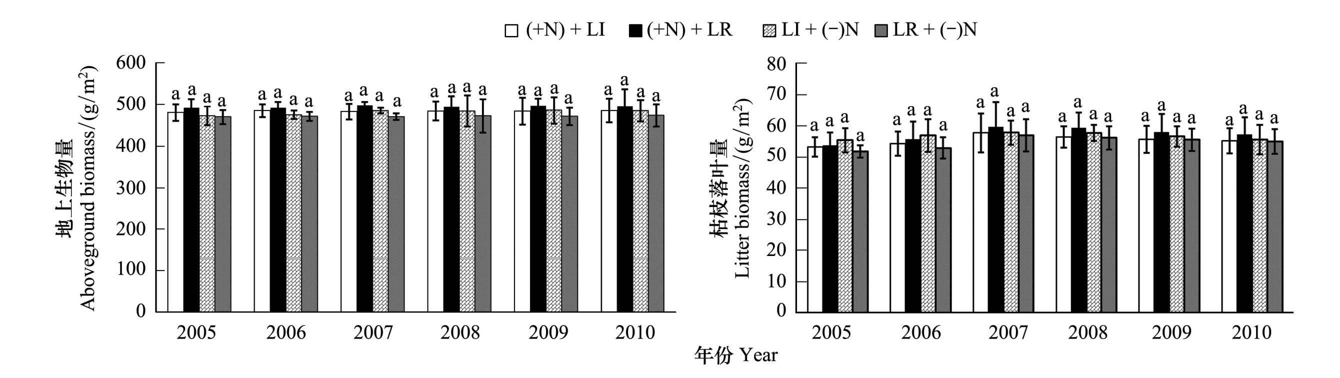
[37] Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(11): 3605-3617.

[38] Zelles L. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. Chemosphere, 1997, 35(1/2): 275-294.

[39] Zogg G P, Zak D R, Ringelberg D B, White D C, Macdonald N W, Pregitzer K S. Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. Soil Science Society of America Journal, 1997, 61(2): 475-481.

[40] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. Biology and

Fertility of Soils, 1999, 29(2): 111-129.
[41] Knoblauch C, Zimmermann U, Blumenberg M, Michaelis W, Pfeiffer E M. Methane turnover and temperature response of methane-oxidizing bacteria in permafrost-affected soils of northeast Siberia. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(12): 3004-3013.
[42] Myers R T, Zak D R, White D C, Peacock A. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems. Soil Science Society of America Journal, 2001, 65(2): 359-367.
[43] Zechmeister-Boltenstern S, Michel K, Pfeffer M. Soil microbial community structure in European forests in relation to forest type and atmospheric nitrogen deposition. Plant and Soil, 2011, 343(1/2): 37-50.
[44] 张焕军, 郁红艳, 丁维新. 长期施用有机无机肥对潮土微生物群落的影响. 生态学报, 2011, 31(12): 3308-3314.
[45] Kimura M, Asakawa S. Comparison of community structures of microbiota at main habitats in rice field ecosystems based on phospholipid fatty acid analysis. Biology and Fertility of Soils, 2006, 43(1): 20-29.
[46] Tunlid A, Hoitink H A J, Low C, White D C. Characterization of bacteria that Suppress *Rhizoctonia* damping off in bark compost media by analysis of fatty acid biomarkers. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(6): 1368-1374.
[47] Ünlü K, Özenirler G, Yurteri C. Nitrogen fertilizer leaching from cropped and irrigated sandy soil in central Turkey. European Journal of Soil Science, 1999, 50(4): 609-620.
[48] Bowman W D, Cleveland C C, Halada Ľ, Hreško J, Baron J S. Negative impact of nitrogen deposition on soil buffering capacity. Nature Geoscience, 2008, 1(11): 767-770.
[49] Lieb A M, Darrouzet-Nardi A, Bowman W D. Nitrogen deposition decreases acid buffering capacity of alpine soils in the southern Rocky Mountains. Geoderma, 2011, 164(3/4): 220-224.
[50] Wei C Z, Yu Q, Bai E, Lü X T, Li Q, Xia J Y, Kardol P, Liang W J, Wang Z W, Han X G. Nitrogen deposition weakens plant-microbe interactions in grassland ecosystems. Global Change Biology, 2013, 19(12): 3688-3697.
[51] Chen D, Lan Z C, Bai X, Grace J B, Bai Y F. Evidence that acidification-induced declines in plant diversity and productivity are mediated by changes in below-ground communities and soil properties in a semi-arid steppe. Journal of Ecology, 2013, 101(5): 1322-1334.
[52] Weintraub M N. Nutrient Dynamics in the Arctic Tundra of Alaska[D]. California: University of California, 2004.
[53] Hodge A, Robinson D, Fitter A. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? Trends in Plant Science, 2000, 5(7): 304-308.
[54] Brinson M M, Lugo A E, Brown S. Primary production, decomposition and consumer activity in freshwater wetlands. Annual Review of Ecology and Systematics, 1981, 12(1): 123-161.
[55] Schipper L A, Cooper A B, Harfoot C G, Dyck W J. Regulators of denitrification in an organic soil. Soil Biology and Biochemistry, 1993, 25(7): 925-933.
[56] 周兴民. 中国嵩草草甸. 北京: 科学出版社, 2001
[57] Haynes R J. Size and activity of the soil microbial biomass under grass and arable management. Biology and Fertility of Soils, 1999, 30(3): 210-216.
[58] 王启兰, 曹广民, 王长庭. 高寒草甸不同植被土壤微生物数量及微生物生物量的特征. 生态学杂志, 2007, 26(7): 1002-1008.
[59] Moore-Kucera J, Dick R P. PLFA profiling of microbial community structure and seasonal shifts in soils of a douglas-fir chronosequence. Microbial Ecology, 2008, 55(3): 500-511.
[60] 杨希智, 王长庭, 字洪标, 刘敏. 三江源区不同建植年限人工草地土壤微生物群落结构特征. 应用与环境生物学报, 2015, 21(2): 341-349.
[61] Byss M, Elhottová D, Tříska J, Baldrian P. Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotusostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study. Chemosphere, 2008, 73(9): 1518-1523.
[62] Nadelhoffer K J, Emmett B A, Gundersen P, Kjønaas O J, Koopmans C J, Schleppi P, Tietema A, Wright R F. Nitrogen deposition makes a minor contribution to carbon sequestration in temperate forests. Nature, 1999, 398(6723): 145-148.
[63] Hagedorn F, Spinnler D, Siegwolf R. Increased N deposition retards mineralization of old soil organic matter. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(12): 1683-1692.
[64] Soussana J F, Loiseau P, Vuichard N, Ceschia E, Balesdent J, Chevallier T, Arrouays D. Carbon cycling and sequestration opportunities in temperate grasslands. Soil Use and Management, 2004, 20(2): 219-230.
[65] Wardle D A. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: A global-scale synthesis. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(13): 1627-1637.



附图　高寒藏嵩草(***Kobresia tibetica***)草甸施肥、枯枝落叶处理条件下地上生物量、枯枝落叶的变化(Mean ± SE, *n*=6)

Attached Fig.　Aboveground biomass (a) and litter biomass (b) over six years in experimental treatment plots with urea N addition and litter manipulations (Error bars indicate ±1 SE. *n*=12 for each treatment)

相同字母表示在 $P=0.05$ 水平下差异不显著

附表　高寒藏嵩草(*Kobresia tibetica*)草甸不同试验处理、不同年份地上生物量、枯枝落叶的双因子方差分析结果

Attached Table　Results of the two-way ANOVA showing the effect of experimental treatments (Fertilization, litter)**, years** (2005—2010)**, and their** (interactions on the AGB) **and litter biomass in a *Kobresia tibetica* meadow over six years** (2005—2010)

Source	Dependent Variable	*df*	*F*	Sig.
处理 Treatment	地上生物量 AGB (g/m^2)	2, 144	2.782	0.065
	枯枝落叶 Litter biomass (g/m^2)	2, 144	1.399	0.250
年份 Year	地上生物量 AGB (g/m^2)	1, 144	2.016	0.093
	枯枝落叶 Litter biomass (g/m^2)	1, 144	2.002	0.095
处理 × 年份 Treatment × Year	地上生物量 AGB (g/m^2)	3, 144	2.467	0.065
	枯枝落叶 Litter biomass (g/m^2)	3, 144	0.957	0.415

AGB: 地上生物量;Aboveground biomass